

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-038246

(43)Date of publication of application : 13.02.2001

(51)Int.Cl.

B03C 5/00
B01D 57/02
B07C 5/342
G01N 15/14
G01N 21/64
G01N 33/48
G01N 33/483
// C12Q 1/02

(21)Application number : 11-219323

(71)Applicant : JAPAN SCIENCE &
TECHNOLOGY CORP

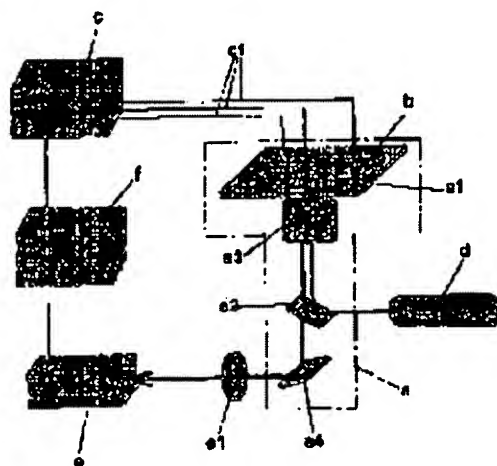
(22)Date of filing : 02.08.1999

(72)Inventor : TSUKIDA SHIYOUICHIRO
FUNATSU TAKASHI(54) METHOD FOR SEPARATING MICRO-COMPONENT OF ORGANISM AND ITS
SEPARATOR

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method and a separator for separating and recovering micro components of organism such as protein molecules and organelles with high accuracy.

SOLUTION: An organism-substance-mixed solution containing a fluorescence- labeled micro-component of an organism, is charged from a charging part into a fine channel member communication with two discharge parts through the branch point from the charging part, and a substance in the solution is made to flow into the fine channel member by applying a voltage to the charging part, and a fluorescence signal is detected by irradiating the branch point of the fine channel member with a laser beam, and the voltage is applied to one of the two discharge parts, depending on the presence of the fluorescence signal labeled to the objective micro-component of the organism, and the solution is recovered from the other



discharge part.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号
特開2001-38246
(P2001-38246A)

(43)公開日 平成13年2月13日(2001.2.13)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	ターミナル*(参考)
B 0 3 C 5/00		B 0 3 C 5/00	Z 2 G 0 4 3
B 0 1 D 57/02		B 0 1 D 57/02	2 G 0 4 5
B 0 7 C 5/342		B 0 7 C 5/342	3 F 0 7 9
G 0 1 N 15/14		G 0 1 N 15/14	C 4 B 0 6 3
21/64		21/64	E 4 D 0 5 4
審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 5 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願平11-219323

(22)出願日 平成11年8月2日(1999.8.2)

(71)出願人 396020800

科学技術振興事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(72)発明者 月田 承一郎

京都府京都市中京区堀町通り二条上ル亀屋

町167 グランフォルム京都御所南502

(72)発明者 船津 高志

東京都東久留米市柳壺1-2-15

(74)代理人 100093230

弁理士 西澤 利夫

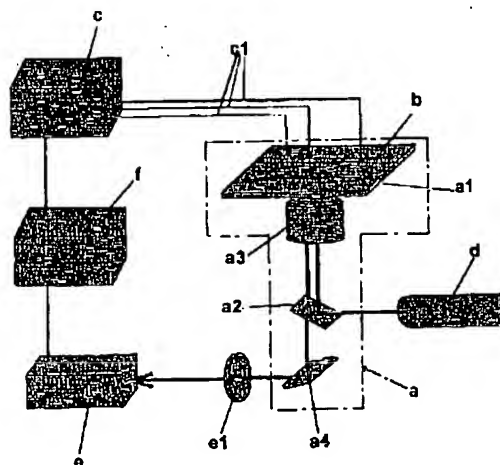
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 生体微小成分の分離方法と分離装置

(57)【要約】

【課題】 タンパク質分子やオルガネラ等の生体微小成分を高精度に分離・回収する方法と装置を提供する。

【解決手段】 注入部から分岐点を介して2ヶ所の排出部に連通する微細流路に、蛍光標識した生体微小成分を含む生体物質混合溶液をその注入部から注入し、注入部に電圧を印加して溶液中物質を微細流路に流し、微細流路の分岐点にレーザーを照射して溶液中物質の蛍光シグナルを検出し、目的とする生体微小成分に標識した蛍光シグナルの有無に応じて2ヶ所の排出部の一方に電圧を印加して他方の排出部から溶液を回収する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 注入部から分岐点を介して2ヶ所の排出部に連通する微細流路に、蛍光標識した生体微小成分を含む生体物質混合溶液をその注入部から注入し、注入部に電圧を印加して溶液中物質を微細流路に流し、微細流路の分岐点にレーザーを照射して溶液中物質の蛍光信号を検出し、目的とする生体微小成分に標識した蛍光信号の有無に応じて2ヶ所の排出部の一方に電圧を印加して他方の排出部から溶液を回収することを特徴とする生体分子およびオルガネラの分離方法。

【請求項2】 蛍光標識した生体微小成分を含む生体物質混合溶液から、目的とする標識成分を分離する装置であって、(a) 蛍光顕微鏡、(b) 蛍光顕微鏡(a)のステージにセットされ、溶液注入部から分岐点を介して2ヶ所の溶液排出部に連通する微細流路を有する透明基板、(c) 透明基板(b)の微細流路の注入部および2ヶ所の排出部にそれぞれ電圧を印加する電源、(d) 透明基板(b)の微細流路の分岐点にレーザーを照射するレーザー照射装置、(e) レーザー照射によって励起された溶液中物質の蛍光強度を検出する蛍光検出器、(f) 蛍光検出器(e)により検出された蛍光強度を分析するとともに、電源(c)による電圧印加を制御する分析・制御装置を備えていることを特徴とする生体分子およびオルガネラの分離装置。

【請求項3】 微細流路の幅が5~100 μ mである請求項2の分離装置。

【請求項4】 溶液注入部から分岐点を介して2ヶ所の溶液排出部に連通する微細流路を有する透明基板。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】この出願の発明は、タンパク質分子やオルガネラ（細胞小器官）等の生体微小成分を分離・精製する分離方法と分離装置（ソーター：sorter）に関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、生物学、化学、医学等の研究開発分野において有用な生体微小成分の分離方法と分離装置に関するものである。

【0002】

【従来の技術】種々の細胞混合物から目的とする細胞を分離・精製する装置として、蛍光細胞解析分離装置（または蛍光活性化セルソーター：fluorescence-activated cellsorter）が広く利用されている。この装置はフローサイトメーター（flow cytometer）の一種であり、レーザー発生装置、光学系、ノズル、データ処理装置等からなり、分別した細胞を一括して採取することが可能である。具体的には、蛍光標識した細胞を細い管に流しながらレーザーを照射して各細胞の蛍光を検出し、液滴中に0個または1個の細胞が入るように液滴を作り、管の出口から落下させる。細胞を含む液滴に、蛍光の有無によって正か負の電荷を与え、さらに電場を加えることに

よって液滴の進路を変え、必要な液滴を回収することによって、目的とする細胞を分離することを可能としている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】各種のゲノム解析プロジェクトの進展により、ヒトをはじめとする様々な生物種の遺伝子配列情報が詳細に理解されるようになってきている。しかしながら、これらの遺伝子情報を有効に活用するためには、遺伝子がコードするタンパク質の機能を解析することが必要であり、そのための研究体制の確立が迫られている。そして、そのようなタンパク質の機能解析のためには、既知のタンパク質を指標として、それと相互作用する未知のタンパク質分子の探索や、特定のオルガネラに含まれる未知の生体成分の探索が重要であり、特定のタンパク質分子やオルガネラを高精度に分離・精製する手段が必須である。

【0004】しかしながら、従来の蛍光細胞解析分離装置では、蛍光の検出感度が低いため、タンパク質分子やオルガネラを分離することは困難であった。また、極微少のタンパク質分子やオルガネラを対象とする場合には、液滴中に標的物質が1個以下になるように調節することも困難であった。

【0005】この出願の発明は以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであって、従来の方法・装置では不可能であった生体微小成分の分離方法と分離装置を提供することを課題としている。

【0006】

【課題を解決するための手段】この出願は、前記の課題を解決するための方法発明として、注入部から分岐点を介して2ヶ所の排出部に連通する微細流路に、蛍光標識した生体微小成分を含む生体物質混合溶液をその注入部から注入し、注入部に電圧を印加して溶液中物質を微細流路に流し、微細流路の分岐点にレーザーを照射して溶液中物質の蛍光信号を検出し、目的とする生体微小成分に標識した蛍光信号の有無に応じて2ヶ所の排出部の一方に電圧を印加して他方の排出部から溶液を回収することを特徴とする生体微小成分の分離方法を提供する。

【0007】またこの出願は、前記の課題を解決するための装置発明として、蛍光標識した生体微小成分を含む生体物質混合溶液から、目的とする標識分子または標識オルガネラを分離する装置であって、(a) 蛍光顕微鏡、(b) 蛍光顕微鏡(a)のステージにセットされ、溶液注入部から分岐点を介して2ヶ所の溶液排出部に連通する微細流路を有する透明基板、(c) 透明基板(b)の微細流路の注入部および2ヶ所の排出部にそれぞれ電圧を印加する電源、(d) 透明基板(b)の微細流路の分岐点にレーザーを照射するレーザー照射装置、(e) レーザー照射によって励起された溶液中物質の蛍光強度を検出する蛍光検出器、(f) 蛍光検出器(e)により検出された蛍光強度を

分析するとともに、電源(c)による電圧印加を制御する分析・制御装置を備えていることを特徴とする生体微小成分の分離装置を提供する。

【0008】なお、この分離装置においては、微細流路の幅が5～100 μ mであることを好ましい態様としてもいい。さらにこの出願は、溶液注入部から分岐点を介して2ヶ所の溶液排出部に連通する微細流路を有する透明基板をも提供する。

【0009】以下、各発明について実施形態を詳しく説明する。

【0010】

【発明の実施の形態】この出願の方法発明は、分離を目的とするタンパク質分子やオルガネラ等の生体微小成分を予め蛍光物質で標識する。蛍光物質としては、例えば、蛍光抗体法等において標識として用いられるフルオレセインイオチオシアネート(FITC)やテトラメチルローダミンイソチオシアネート(TRITC)等を用いることができる。あるいはまた、遺伝子工学的な手法により、分子・オルガネラを緑色蛍光タンパク質(GFR: green fluorescent protein)との融合タンパク質として発現させることもできる。GFR遺伝子はオワンクラゲからクローニングされており、このGFR遺伝子と特定のタンパク質の遺伝子とを連結してベクターに組み込み、適当な宿主細胞に導入すれば、この宿主細胞の産生物としてGFR標識タンパク質分子を得ることができる。

【0011】このようにして蛍光標識した生体微小成分は、他の生体物質と共に、生理食塩水や適当な緩衝液等により希釈して混合溶液とし、この出願によって提供される透明基板の微細流路に流す。

【0012】透明基板の微細流路は、例えばガラス板等の透明板を気相エッチングや液相エッチング等の公知の手法により微細切削加工することによって形成することができる。微細流路の幅は、5～100 μ mの範囲とすることができる。

【0013】微細流路は一端に溶液注入部を備えており、流路途中の分岐点から二股に分かれ、それぞれの終端に溶液排出部を備えている。そして、注入部および2ヶ所の排出部にはそれぞれ電圧を印加できるようになっており、この電圧印加による電気浸透現象あるいは電気泳動現象によって、注入部から注入した溶液を微細流路内に移行させるとともに、いずれか一方の排出部から溶液を排出させることができるようになっている。注入する溶液の流量は100pl/sec～100nl/sec程度であり、溶液中の生体物質の濃度は5fM～50pM程度とすることができる。印加する電圧は、注入部および排出部の各々において0～2000V程度とすることができる。また、微細流路の長さは、注入部から分岐点までが5～20mm程度、分岐点から2ヶ所の排出部までの流路がそれぞれ5～20mm程度とすることができる。

【0014】図1は、微細流路の構成を例示した模式図である。注入部(1)に生体物質(2)の混合溶液を注入し、注入部(1)に電圧を印加して溶液を微細流路(3)に流す。そして、微細流路(3)の分岐点(4)において蛍光シグナルを検出・分析することによって溶液中に目的とする生体微小成分が存在するか否かを判定する。目的成分の存在を示す蛍光シグナルが検出されない場合には、図1Aに示したように一方の排出部(5)には電圧を印加せず、他方の排出部(6)には電圧を印加して、溶液を排出部(5)から排出させる。

【0015】一方、生体物質中(2)中に目的とする分子・オルガネラが存在することを示す蛍光シグナルが検出された場合には、図1Bに示したように、注入部(1)と排出部(5)に電圧を印加し、電圧を印加していない排出部(6)から溶液を排出させ、目的とする分子・オルガネラを回収する。

【0016】蛍光標識した生体微小成分は、レーザーによって蛍光を励起し、蛍光顕微鏡によって蛍光を集め、検出器によって蛍光シグナルを分析することによって特定することができる。蛍光顕微鏡としては、共焦点レーザー顕微鏡等を用いることができる。蛍光シグナルの分析は、コンピューター等も用いて行うことができる。また、このコンピューターは、蛍光シグナルの分析結果に応じて、電圧印加を制御するためにも用いることができる。

【0017】以上のとおりの分離方法は、この出願によって提供される透明基板の他は、既存の装置、部品等を組み合わせて実施することができるが、この出願によって提供される分離装置を用いることによって、さらに簡便かつ確実にこの出願の方法発明を実施することができる。

【0018】以下、実施例としてこの分離装置の構成を例示するが、この装置発明は以下の例によって限定されるものではない。

【0019】

【実施例】図2は、この出願の分離装置を例示した構成図である。蛍光顕微鏡(a)のステージ(a1)には透明基板(b)がセットされている。この透明基板(b)には微細流路が形成され、その溶液注入部および2ヶ所の溶液排出部には各々、電源(c)からの配線(c1)が接続している。

【0020】レーザー照射装置(d)から発せられたレーザー光は、蛍光顕微鏡(a)のダイクロイックミラー(a2)および対物レンズ(a3)を介して、透明基板(b)の微細流路分岐点に照射され、このレーザー光により蛍光が励起される。励起された蛍光は、対物レンズ(a3)、ダイクロイックミラー(a2)を通過してミラー(a4)に反射し、蛍光検出器(e)に送られる。その際に、蛍光以外の背景光はフィルター(e1)によって取り除かれている。

【0021】蛍光検出器(e)によって検出された蛍光シグナルは、さらに分析・制御装置(f)により分析され、

その分析結果に応じて分析・制御装置(f)は電源(c)を制御し、透明基板(b)の微細流路のいずれか一方の溶液排出部に電圧を印加して溶液を排出させる。

【0022】以上の構成からなる分離装置によって、例えばGFP標識した特定タンパク質、またはGFP標識タンパク質を含むオルガネラ等を高精度に、しかも連続的に分離することが可能である。

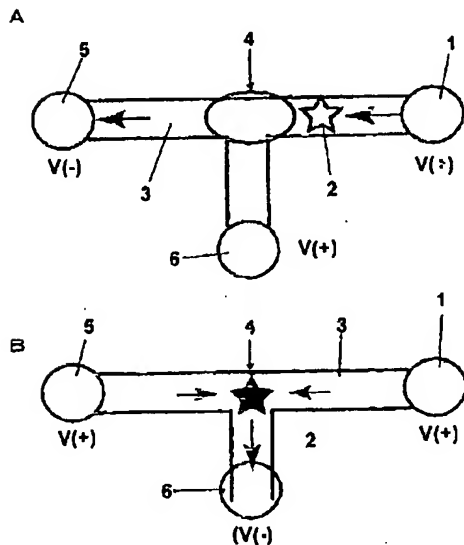
【0023】

【発明の効果】以上詳しく説明したとおり、この出願の方法発明および装置発明によって、従来は不可能であったタンパク質成分やオルガネラ等の生体微小成分の正確かつ簡便な分離・回収が可能となる。これによって、回収したタンパク質、あるいはオルガネラ中のタンパク質のアミノ酸部分配列を決定したり、あるいは2次元電気泳動マップと比較することなどにより、極微量試料からの未知タンパク質の同定や、そのタンパク質の機能推定が可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図1】AおよびBは、この出願によって提供される透明基板の微細流路構成と、その作用メカニズムを例示した模式図である。

【図1】

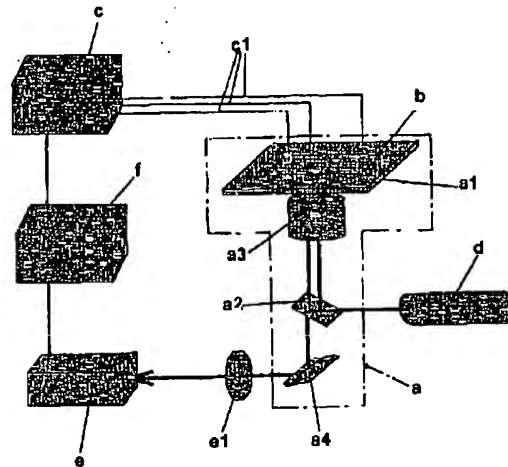


【図2】この出願によって提供される装置発明の構成例を示した模式図である。

【符号の説明】

- 1 溶液注入部
- 2 生体物質
- 3 微細流路
- 4 分岐点
- 5 排出部
- 6 排出部
- a 蛍光顕微鏡
- a1 ステージ
- a2 ダイクロイックミラー
- a3 対物レンズ
- a4 ミラー
- b 透明基板
- c 電源
- c1 配線
- d レーザー照射装置
- e 蛍光検出器
- e1 フィルター
- f 分析・制御装置

【図2】



フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁷

G 0 1 N 21/64

33/48

33/483

// C 1 2 Q 1/02

識別記号

F I

G 0 1 N 21/64

33/48

33/483

C 1 2 Q 1/02

(参考)

F

M

C

F ターム(参考) 2G043 AA04 BA16 CA03 DA05 EA01
FA02 GA07 GB11 HA01 HA02
JA02 KA09 LA01
2G045 AA02 BB03 CB01 FA12 FA16
FA34 FB07 FB12 JA07
3F079 AD17 CA31 CA37 CB25 CB31
CC05
4B063 QA01 QQ08 QQ79 QR66 QS12
QS39 QX02
4D054 FA10 FB11 FB12 FB18